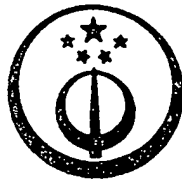


[19]中华人民共和国专利局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21]申请号 92105662.1

[51]Int.Cl⁵

C12P 7/58

[43]公开日 1994年2月2日

[22]申请日 92.7.18

[71]申请人 北京制药工业研究所

地址 100020北京市朝阳区东大桥路12号

[72]发明人 唐洁宇 王彩红 王欣

[74]专利代理机构 北京市医药医疗器械专利代理事

务所

代理人 张秀英

C12N 1/20

// (C12P7/58 C12R1:01)

说明书页数: 3

附图页数:

[54]发明名称 提高产2-酮-L-古龙酸混合细菌转化活力的方法

[57]摘要

本发明为一种能强化从山梨糖生产2-酮-L-古龙酸混合细菌活力的菌种选育方法和保藏方法。在搞清混菌的互生关系和拮抗关系后,利用不良因子激发细菌产酸能力并使用生物抑制剂对细菌进行处理,使高活力小菌与拮抗力大的伴生菌共存,以此提高菌种活力。经强化的菌种,经冷冻干燥可长时间内保持活力不变。

(BJ)第 1456 号

BEST AVAILABLE COPY

权 利 要 求 书

1、一种强化从山梨糖产2-酮-L-古龙酸的混合细菌转化能力的方法，其特征在于强化菌种能在高基质浓度高转化率地生产2-酮-L-古龙酸，包括菌种的选育处理、筛选和保藏。

2、如权利要求1所述的强化方法，其特征在于利用通气不足，贫乏培养基，长时间冷冻保藏和利用生物抑制剂对氧化葡萄糖酸杆菌(简称小菌)进行处理，提高其产酸能力。

3、如权利要求2所述的生物抑制剂，其特征是指2，4-二硝基苯酚和二价铜离子。

4、如权利要求1所述的方法，其特征在于强化过程包括经处理后的小菌再用复壮的办法恢复生长。

5、如权利要求4所述的复壮办法，其特征是在固体培养基中加入预先培养好的大菌清液。

6、如权利要求1所述的强化菌种，其特征是强化小菌(EP130)和伴生菌中的任一之混合细菌。

7、如权利要求6所述的强化混合菌种，其特征在于伴生菌包括腊状芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、产酰胺酶大肠杆菌、解淀粉芽孢杆菌等。

8、如权利要求1所述的方法，其特征在于混合菌种的保藏办法为高活力小菌必须与拮抗力大的伴生菌共存，用冷冻干燥法保藏。

提高产2-酮-L-古龙酸混合细菌转化活力的方法

本发明为一种能强化从山梨糖生产2-酮-L-古龙酸(简写2-KGA)混合细菌活力的菌种选育方法和保藏方法,使菌种保持在高活力水平,适合工业生产应用。

现用的生产维生素C前体2-KGA的混合细菌发酵是我国首先应用于工业生产的(尹光琳等,微生物学报20(3),P246,1980)。长期以来,由于缺乏对混合菌种的选育和保藏方法,所以转化率不高,生产不稳定;菌种不易保藏。本发明的主要内容为提供一高活力菌株,使培养物更有效地产生2-KGA。并建立方法使获得的混合菌株在使用上方便、性能稳定,可长时间保藏,不降低活力。

本发明是经过以下过程实现的,首先搞清混合菌中两个菌的相互关系,其中氧化葡萄糖酸杆菌(简称小菌)是产生2-KGA的主要菌,它依靠伴生菌(芽胞杆菌或其它菌,简称大菌)才能良好的产生2-KGA。提高小菌的产酸能力是提高转化率的关键。经研究发现两菌之间除存在着互生关系外,还有拮抗关系,其拮抗程度随所用的不同大菌而不同。拮抗性大的,小菌生长弱,但活力高。我们利用不良因子激发并提高小菌产酸能力,如通气不足,贫乏培养基,与拮抗性大的伴生菌长时间冷冻保存,以及使用生物抑制剂(2,4-二硝基苯酚及二价铜离子)等手段对小菌进行处理。处理后的小菌生长减弱,但可通过复壮恢复生长。

其复壮办法为,在固体培养基中加入预先培养好的大菌菌液(含玉米浆成份),使小菌菌落变大,菌形粗壮。而后进行单菌落

筛选。选取高活力的小菌菌株。用冷冻干燥法保藏。高活力小菌必须与拮抗大的伴生菌共存，才可以使菌株在长时间内保持活力不变。

实例，

一、培养基的组成(%) (每100毫升培养基所用克数)

混合细菌在以下培养基分离、培养复壮和检查活力。

1、斜面固体培养基(包括分离用培养基)

A培养基：山梨糖 0.5；牛肉膏 0.3；酵母膏 0.3；蛋白胨 1.0；
MgSO₄ 0.2；洋葱 2.0；pH 7.0-7.2。

B培养基：加入预先培养好的大菌清液(含玉米浆成份)，其它同上。

2、种子液体培养基组成(%)，

玉米浆 1.0；山梨糖 1.0；脲 0.2；CaCO₃ 0.1；pH 6.4-6.7。

3、摇瓶发酵培养基组成(%)，

山梨糖 7-8；玉米浆 1.0；脲 1.2，pH 6.4-6.7。

二、处理过程(EP130强化小菌的获得)，

混合细菌→B培地分离→E小菌

E小菌+拮抗性大菌

A培地搭配培养

抑制剂处理

B培地培养

不良环境选育

→A培地分离→AB反复交叉→筛选→EP130小菌

三、强化后菌种活力情况

	原菌种	强化菌种
纯小菌生长	只在B培地生长	A培地亦长
纯小菌生长时间	3天	2天
纯小菌转化活力 (基质浓度50g/l)	2-3g/l	26.18g/l
混菌效果 (基质浓度70-80g/l)	58-65g/l	68-75g/l
混菌斜面保存时间 (冰箱4℃)	超过一个月活力 下降80%以上	四个月活力不降
转化能力稳定性	不稳定	稳定

结果证明，经处理后纯小菌活力提高为原来的5-10倍，混菌转化能力比原水平提高5-10%，冷冻管经保存五年活力不降。